

09/856720  
PCT/JP99/06847

07.12.99

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 21 JAN 2000	
WIPO	PCT

EKV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年12月 7日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第347003号

出 願 人  
Applicant (s):

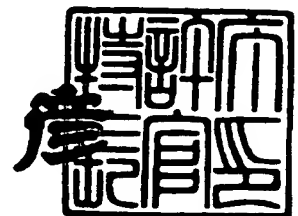
第一化学薬品株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3092879

【書類名】 特許願

【整理番号】 MP-940

【提出日】 平成10年12月 7日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【発明の名称】 ホモシステインの定量法

【請求項の数】 3

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会  
社 診断薬研究所内

    【氏名】 海老沼 宏幸

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会  
社 診断薬研究所内

    【氏名】 牛澤 幸司

【特許出願人】

    【識別番号】 390037327

    【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100086689

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 松井 茂

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 002071

    【納付金額】 21,000円

---

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ホモシステインの定量法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ホモシステインを含む試料に、チオール化合物の存在下、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させ、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することを特徴とするホモシステインの定量法。

【請求項 2】 ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素が、酵素番号 EC クラス 4. 2. 99 に属する O-アセチルホモセリン-リアーゼである請求項 1 記載のホモシステインの定量法。

【請求項 3】 ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させる時、共存させるチオール化合物が、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンから選ばれた 1 つである請求項 1 及び 2 記載のホモシステインの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ホモシステインを含む試料に、チオール化合物共存下で、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させ、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することを特徴とする簡便で正確なホモシステインの定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体中の蛋白質を構成する硫黄含有アミノ酸としては、メチオニン、システイン、シスチンが知られており、生体内では、それぞれが一連の代謝サイクルの中で恒常性を維持している。食物中の蛋白質から由来するメチオニンは、通常上記代謝サイクルにより生体内でシステインに代謝される。しかし、代謝酵素自身やその関連因子等の異常により上記代謝サイクルに支障をきたすと、メチオニンはホモシステインに代謝される。

【0003】

ホモシステインは、正常時にはほとんど存在しない中間代謝物であり、その血液中濃度が高値となると、冠動脈疾患や脳卒中の発生率が高くなるという報告がなされている。ホモシステインの生体内動態は、関連酵素及びその補酵素であるビタミンB12や葉酸の存在と関連付けられ注目されており、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓塞栓症あるいは動脈硬化症において、独立したリスクファクターとして確立されつつある。

【0004】

ホモシステインの酵素的定量法において、使用される酵素としては、脱硫及び脱アミノ反応を触媒するL-メチオニン $\gamma$ -リアーゼやホモシステインデスルフハイドラーゼなどが知られている。

【0005】

L-メチオニン $\gamma$ -リアーゼ (EC 4. 4. 1. 11) は、ホモシステインとチオール化合物の存在下で $\gamma$ 置換反応を触媒し、硫化水素並びにチオール化合物置換ホモシステインを生成する作用を有すると共に、チオール化合物非存在下では脱離反応 (脱硫及び脱アミノ) を触媒する作用も有する2面性を持った酵素で、一部の細菌 (シュードモナス属及びクロストリジウム属) で産生が認められるのみであった。

【0006】

更に、ホモシステインデスルフハイドラーゼ (EC 4, 4, 1, 2) に関しても、真菌類 (トリコモナス属) にその存在が確認されているのみであった。

【0007】

一方、アミノ酸合成酵素であるO-アセチルホモセリン-リアーゼ (O-アセチルホモセリン-スルフハイドリラーゼあるいはメチオニン合成酵素、EC 4. 2. 9. 9. 10) が、O-アセチルホモセリンとメタンチオールからメチオニンと酢酸、又はO-アセチルホモセリンと硫化水素からホモシステインと酢酸を生成することは知られており、「酵素ハンドブック」 (丸尾ら監修、朝倉書店、1982年) にも記載されている。

【0008】

しかしながら、上記アミノ酸合成酵素が、ホモシステインとチオール化合物の存在下で  $\gamma$  置換反応を触媒し、硫化水素ならびにチオール化合物置換ホモシステインを生成する作用を有することは知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

このように、上述した L-メチオニン  $\gamma$ -リアーゼとホモシステインデスルフィドラーゼ以外で、ホモシステインに対して分解作用を有する酵素の存在は知られていないのが現状であった。

【0010】

したがって、本発明の目的は、ホモシステインに作用する新規な酵素反応を利用した簡便で正確なホモシステインの定量法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するため、本発明者らは、ホモシステインの分析に利用可能な酵素の探索を行った結果、アミノ酸合成酵素である O-アセチルホモセリン-リアーゼを種々のチオール化合物存在下においてホモシステインに作用させると、特異性よくホモシステインを分解することを見出した。更に、上記アミノ酸合成酵素による反応は、L-メチオニン  $\gamma$ -リアーゼと同様に、ホモシステインと種々のチオール化合物の  $\gamma$  置換反応によるものであるが、脱離反応が認められないことから、L-メチオニン  $\gamma$ -リアーゼとは異なる機構でホモシステインに作用することが確認された。

【0012】

本発明は、上記知見に基づいて完成されたものであり、ホモシステインを含む試料に、チオール化合物の存在下、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させ、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することを特徴とするホモシステインの定量法を提供するものである。

【0013】

なお、本発明においては、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素が、酵素番号 EC クラス 4. 2. 99 に属する O-アセチルホモセリン-リアーゼであ

ることが好ましい。

【0014】

また、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させる時、共存させるチオール化合物が、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンから選ばれた1つであることが好ましい。

【0015】

本発明によれば、ホモシステインを含む試料に、チオール化合物の存在下で、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させることにより、ホモシステインとチオール化合物の $\gamma$ 置換反応によって、ホモシステインが特異性よく分解され、硫化水素及びチオール化合物置換ホモシステインが生成される。したがって、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することにより、試料中のホモシステイン含量を、正確にかつ簡便に定量することができる。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられるアミノ酸合成酵素としては、ホモシステインに反応するものであれば特に限定されないが、例えばO-アセチルホモセリン-リアーゼが好ましく採用される。O-アセチルホモセリン-リアーゼは、それを産生する微生物から得ることができる。その微生物としては、細菌ではバチルス属等、酵母ではサッカロミセス属、真菌ではニューロスポラ属 (J. B. C., 246, 95-102, 1971) が知られている。例えば、山縣らの方法 (J. Biochem., 80, 777-785, 1976) によって、サッカロミセスセルビシエよりO-アセチルホモセリン-リアーゼを精製することができる。また、O-アセチルホモセリン-リアーゼは、市販されているものもあり、例えばユニチカ株式会社等から入手できる。ユニチカ株式会社製のバチルス属由来のO-アセチルホモセリン-リアーゼの理化学的性質は次の通りである。なお、下記理化学的性質のうち、分子量以外の項目は、本発明者らにより求めたものである。

【0017】

<理化学的性質>

- 1) 作用: L-ホモシステインとチオール化合物の  $\gamma$  置換反応を触媒し、硫化水素及びチオール化合物置換ホモシステインを生成する。また、L-メチオニンとチオール化合物の置換反応を触媒し、メタンチオール及びチオール化合物置換ホモシステインを生成する。
- 2) 基質特異性: L-ホモシステイン、L-メチオニンに作用する。また、L-システインには  $\beta$  置換反応として若干反応する。
- 3) 分子量: 180,000 (ゲル濾過法)
- 4) 至適 pH: 8.5~9.0
- 5) Km: 0.9 mM (L-ホモシステイン)

【0018】

本発明で用いられるチオール化合物は、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンなど、置換反応が行えるものであれば特に制限なく、好適なものとしては、2-メルカプトエタノールやシステアミンが挙げられる。

【0019】

本発明のホモシステインの定量法は、反応過程あるいは、反応生成物を利用して測定する方法であり、次にその内容を説明する。

【0020】

(1) 硫化水素を利用する方法

本酵素をチオール化合物共存下で、ホモシステインに作用させると硫化水素が発生する。その硫化水素を定量する方法は、公知の方法を使用することができ、硫化水素を直接定量する方法のみならず、硫化水素に起因する硫化物イオンを定量する方法であってもよい。例えば、①酸性条件下で酢酸鉛紙の黒変を検出する方法、②亜鉛を用いて、生成する硫化亜鉛の沈殿を検出する方法、さらに発色検出として、③ニトロプルシッドナトリウムとの反応では、アルカリ条件下、イオウイオンとして紫色に発色させる方法、④強酸性下で、N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミンと塩化第二鉄を用いてメチレンブルーを生成させ青色発色を検出する方法などがある。

## 【0021】

## (2) チオール化合物置換ホモシステインを利用する方法

本酵素をチオール化合物共存下で、ホモシステインに作用させるとチオール化合物置換ホモシステインが生成する。生成したチオール化合物置換ホモシステインは、後述するようにHPLC分析を行い、そのピーク面積を数量化することにより定量できる。

## 【0022】

また、より高感度に検出する場合は、ラジオアイソトープなどで標識を行ったチオール化合物を用いて標識チオール化合物置換ホモシステインのピークを同様にして検出することで可能となる。

## 【0023】

## 【実施例】

以下、試験例及び実施例を挙げて、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。以下の試験例及び実施例では、O-アセチルホモセリン-リアーゼとして、バチルス属由来のO-アセチルホモセリン-リアーゼ（ユニチカ株式会社製）を用いた。以下の説明では、上記O-アセチルホモセリン-リアーゼを「本酵素」として説明する。

## 【0024】

## 試験例 1

20 mM 2-メルカプトエタノール及び10 mM DL-ホモシステイン（アルドリッチ社）を含有する100 mM トリス・塩酸緩衝液（pH 8.5）に本酵素を添加し、37℃で反応させ、経時的に反応液中の生成物と反応のモルバランスを、表1に示す条件でHPLCにて分析した。



【0025】

【表1】

カラム	TSK gel Amide-80
溶離液	アセトニトリル：水＝7：3
カラム温度	40℃
流速	1.0 ml / 分
検出器	示差屈折率計 (RI)

【0026】

その結果、反応の進行と共にリテンションタイム6.7分のDL-ホモシステインのピークが減少し、新たにリテンションタイム7.8分の位置に反応生成物のピークが現れた。この反応のモルバランスは一致していた。

【0027】

## 試験例2

DL-ホモシステインをL-メチオニンに換え、試験例1と同様の条件で反応させた。また、本酵素と同様の作用を有すると考えられるL-メチオニンγ-リアーゼ（和光純薬株式会社製）を本酵素に換えて添加し、同様の条件で反応させ、HPLCで分析を行った。

【0028】

その結果、いずれの場合もリテンションタイム7.8分の位置に反応生成物のピークが現れた。

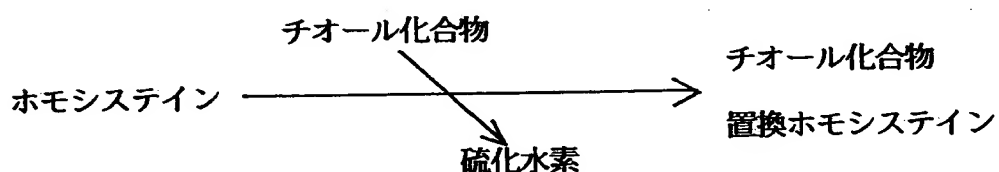
【0029】

試験例1及び2の結果において、本酵素をDL-ホモシステイン及びL-メチオニンに作用させた場合の反応生成物のリテンションタイムが共に一致している

こと、更にL-メチオニナーリアーゼを作用させた場合の反応生成物のリテンションタイムもすべて一致していることから、本酵素の作用は、下記化学式1及び化学式2に示す通り、含硫アミノ酸とチオール化合物の置換反応であることがわかった。

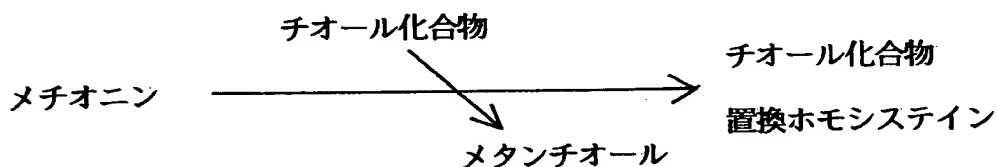
【0030】

【化1】



【0031】

【化2】



【0032】

実施例1 (ホモシステインの定量)

200mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)0.25mlに、20mM2-メルカプトエタノールを0.1ml加え、さらに各種濃度(0~100 $\mu$ M)のL-ホモシステイン(シグマ社製)溶液を0.1ml加えた後、37℃で5分間加温した。その液に、O-アセチルホモセリナーリアーゼ酵素液(20u/ml)を0.05ml加え、37℃で10分間反応させた後、3%NaOH液を0.1ml、16mM N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミン・硫酸塩溶液0.325ml及び10mM塩化第二鉄塩酸溶液0.075mlを順次添加し、室温で15分放置後、670nmの吸光度を測定して検量線を作成した。その結果を図1に示した。

【0033】

図1に示されるように、この検量線は、0~200 $\mu$ M(L-ホモシステイン

換算)まで直線となり、本酵素が触媒する置換反応を利用してホモシステインの定量が可能であることが分かった。

【0034】

【発明の効果】

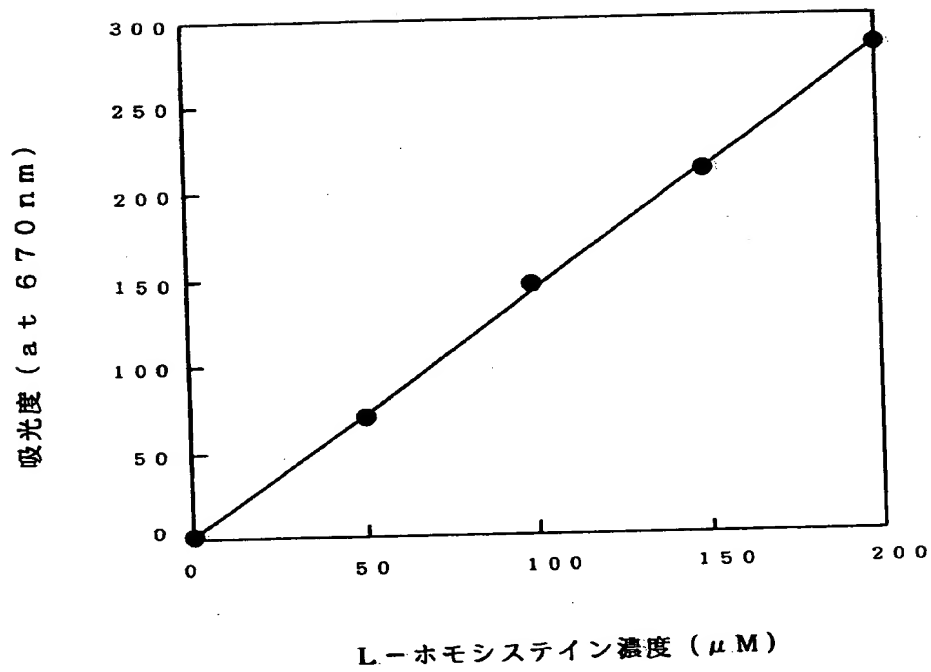
以上説明したように、本発明によれば、ホモシステインを含む試料に、チオール化合物の存在下で、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させることにより、ホモシステインとチオール化合物の $\gamma$ 置換反応によって、ホモシステインが特異的に分解され、硫化水素及びチオール化合物置換ホモシステインが生成されるので、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することにより、試料中のホモシステイン含量を正確にかつ簡便に定量することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法によりホモシステインを反応させて得た検量線を示す図表である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便で正確なホモシステインの定量法を提供する。

【解決手段】 ホモシステインを含む試料に、チオール化合物の存在下、ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素を作用させ、生成された硫化水素又はチオール化合物置換ホモシステインを測定することにより、ホモシステインを定量する。ホモシステインに反応するアミノ酸合成酵素としては、酵素番号ECクラス4. 2. 99に属するO-アセチルホモセリン-リアーゼが好ましく用いられる。また、チオール化合物としては、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンから選ばれた1つが好ましく用いられる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 390037327  
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目13番5号  
【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100086689  
【住所又は居所】 東京都中央区銀座8-16-5 銀座轟ビル7階  
松井特許事務所  
【氏名又は名称】 松井 茂

特平10-347003

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390037327]

1. 変更年月日 1990年12月12日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目13番5号  
氏 名 第一化学薬品株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**